



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
"Scienze e tecnologie vegetali,
microbiologiche e genetiche"

Indirizzo "Scienze Genetiche e Microbiologiche e Bioinformatica"

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Paolo Capretti

Fighting *Burkholderia cepacia*
complex: exploring virulence, new
antimicrobials and antibiotics
resistance

Settore Scientifico Disciplinare BIO/18

Dottorando

Dott.ssa Perrin Elena

Tutore

Prof. Fani Renato

Coordinatore

Prof. Capretti Paolo

Anni 2011/2013

Declaration

I hereby declare that this submission is my own work and that, to the best of my knowledge and belief, it contains no material previously published or written by another person nor material which to a substantial extent has been accepted for the award of any other degree or diploma of the university or other institute of higher learning, except where due acknowledgment has been made in the text.

Florence, 31/12/2013

A copy of the thesis will be available at <http://www.dispaa.unifi.it/mdswitch.html>

Dichiarazione

Con la presente affermo che questa tesi è frutto del mio lavoro e che, per quanto io ne sia a conoscenza, non contiene materiale precedentemente pubblicato o scritto da un'altra persona né materiale che è stato utilizzato per l'ottenimento di qualunque altro titolo o diploma dell'Università o altro istituto di apprendimento, a eccezione del caso in cui ciò venga riconosciuto nel testo.

Firenze, 31 /12/ 2013

Una copia della tesi sarà disponibile presso DISPAA , sez.

<http://www.dispaa.unifi.it/mdswitch.html>

Alla mia famiglia

***“Il processo di una
scoperta scientifica è,
in effetti,
un continuo
conflitto di meraviglie.”***

Albert Einstein

Riassunto

Scopo: L'obiettivo principale di questa tesi è stato la caratterizzazione delle proteine RND (Resistance- Nodulation- Cell Division) nel genere *Burkholderia*, che comprende numerose specie, tra cui alcuni patogeni opportunisti per l'uomo. Tra questi, le specie del *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) (un gruppo di batteri strettamente correlati tra di loro) possono causare infezioni nei pazienti affetti da Fibrosi Cistica. Sebbene queste infezioni non siano molto frequenti, il tasso di mortalità nei pazienti infetti è molto alto, principalmente a causa della capacità di questi batteri di produrre un'ampia varietà di fattori di virulenza e alla loro alta resistenza agli antibiotici, che è dovuta principalmente alla presenza dei sistemi di efflusso RND. Nei batteri Gram-negativi queste proteine si associano generalmente con altre due proteine a formare un complesso che permette l'estruzione dei substrati direttamente all'esterno della cellula. I geni che codificano queste proteine sono generalmente associati tra di loro a formare un operone.

In parallelo a questo argomento principale, è stata svolta anche una caratterizzazione dei 18 ceppi tipo delle specie che attualmente costituiscono il Bcc, al fine di espandere la conoscenza di queste specie, in particolare di quelle definite solo recentemente.

Metodi e risultati: La caratterizzazione delle proteine RND nel genere *Burkholderia* ha previsto l'utilizzo di due approcci diversi, uno *in silico* e uno sperimentale. In aggiunta, alcuni estratti naturali sono stati provati sia sui 18 ceppi tipo del Bcc sia su alcuni mutanti deleti negli operoni RND, al fine di trovare nuove sostanze ad azione antimicrobica o in grado di bloccare l'azione dei sistemi di efflusso.

È stata effettuata un'analisi della presenza e della distribuzione delle proteine RND in alcuni genomi completamente sequenziati di ceppi appartenenti al genere *Burkholderia*. L'operone RND-4, uno dei più conservati e coinvolto nella resistenza a numerosi antibiotici, è stato caratterizzato utilizzando tecniche di trascrittomica,

proteomica e fenomica, rivelando di essere coinvolto in numerosi processi cellulari (come ad esempio la motilità, la chemiotassi, il metabolismo dei nucleotidi e degli aminoacidi) e non solo nella resistenza agli antibiotici. La caratterizzazione sperimentale di altre proteine RND è ancora in corso.

Inoltre, i 18 ceppi tipo delle specie che costituiscono il Bcc e alcuni mutanti deleti in vari operoni RND sono stati utilizzati per valutare la loro sensibilità a sei oli essenziali. Tutti gli oli si sono rivelati in grado di inibire la crescita delle specie del Bcc, ma *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e *Eugenia caryophyllata* sono risultati i più attivi. Gli operoni RND sembrano essere coinvolti nell'efflusso di alcune delle componenti degli Oli essenziali utilizzati.

Per quanto riguarda la virulenza, è stata effettuata un'analisi dei fattori di virulenza dei 18 ceppi tipo delle specie del Bcc utilizzando il sistema modello *Caenorhabditis elegans*. I risultati ottenuti hanno evidenziato la capacità da parte di questi ceppi di infettare e uccidere *C. elegans* utilizzando principalmente due meccanismi. Inoltre due trasportatori ABC risultano coinvolti nel processo di infezione e ulteriori studi sono in corso per comprendere il ruolo di questi due trasportatori.

Conclusioni: La caratterizzazione delle proteine RND e la conoscenza del loro ruolo fisiologico sono due punti fondamentali per lo sviluppo di strategie per bloccare la loro azione. Inoltre, i dati preliminari sulla sensibilità delle specie di *Burkholderia* agli oli essenziali sono particolarmente incoraggianti, in quanto essi potrebbero rappresentare un'alternativa agli antibiotici nel combattere le infezioni causate da questi batteri.

Infine, le informazioni ottenute dagli esperimenti nel modello *C. elegans* saranno la base per ulteriori test sperimentali mirati ad individuare geni coinvolti nella virulenza di queste specie e che potrebbero rappresentare dei nuovi target terapeutici.

Significato e impatto dello studio: Tutti i dati ottenuti in questo lavoro rappresentano delle importanti basi per lo sviluppo di nuove strategie per

combattere le infezioni causate dai batteri del Bcc. Si tratta infatti di approcci diversi per trovare una terapia efficiente per combattere questi batteri.

E' in corso il sequenziamento e la caratterizzazione fenotipica dei 18 ceppi tipo delle specie del Bcc. I dati ottenuti permetteranno di avere una maggiore conoscenza dei fattori di virulenza, dei meccanismi di infezione e della resistenza agli antibiotici di questi batteri.

Summary

Aims: The main object of this thesis was the characterization of RND (Resistance-Nodulation- Cell Division) proteins in the *Burkholderia* genus, which comprises different species, including opportunistic human pathogen. Among them, *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) species (a group of closely related bacteria) can cause chronic infections in Cystic Fibrosis patients and although they are not very frequent, the mortality rate among infected patients is very high, mainly due to the ability of these bacteria to produce a wide variety of potential virulence factors and to their high resistance to antibiotics, which is mainly due to RND efflux systems. RND proteins are proton efflux pumps that in Gram-negative bacteria often function in association with two other proteins to form a complex that allows the extrusion of substrates directly out of the cell. The genes coding for these proteins are usually associated in an operon.

In parallel to this main topic , the type strains of the 18 species actually included in the Bcc have been characterized from different viewpoints, in order to expand the knowledge of these species, especially of those only recently defined.

Methods and Results: The characterization of RND proteins in the *Burkholderia* genus involved the use of two different approaches, an *in silico* one and a wet-lab one. In addition, some natural extract were tested both on the 18 Bcc type strains and on some RND operons deletion mutants, in order to find new antimicrobial compounds or efflux pumps inhibitors.

An analysis of the presence and distribution of RND proteins in some completely sequenced *Burkholderia* genomes was performed. RND-4 operon, one of the most conserved and involved in resistance to many antibiotics, was characterized from a transcriptomic, proteomic and phenomic viewpoint, proving to be involved in many cellular process (for example motility, chemotaxis, nucleotide and aminoacid

metabolism) and not only in antibiotics resistance. The experimental characterization of other RND proteins is still in progress.

In addition, the 18 Bcc type strains and some RND operons deletion mutants were used for testing their sensibility to six essential oils. All of them are able to inhibit the growth of Bcc strains, but *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* and *Eugenia caryophyllata* are the most active in inhibiting Bcc growth. RND operons seem to be involved in the efflux of some of the components of these EOs.

Regarding virulence, an analysis of the pathogenicity determinants of the 18 type strains of Bcc species by using the non-vertebrate host *Caenorhabditis elegans* was performed. Data obtained revealed that different Bcc species have a different ability to infect the host and that they are able to kill *C. elegans* with mainly two mechanisms. Moreover the nematode ABC transporters *mrp-3* and *mrp-4* were found to be involved in the Bcc infection process and further studies are required to better understand the role of these transporters.

Conclusions: The characterization of RND proteins and the knowledge of their physiological roles are fundamental for the development of a strategy to block their action. In addition preliminary data about the sensitivity of Bcc species and RND mutants to Essential Oils are particularly encouraging, since they demonstrate that their use might represent an alternative way to fight Bcc growth.

Finally the information obtained from the experiment in *C. elegans* model will be the basis for future experimental tests aimed to uncover Bcc virulence genes that can be exploited as novel therapeutic target.

Significance and Impact of the Study: All data obtained represent an important basis for the development of new strategies to fight Bcc infections. Indeed, all the approaches proposed, are different ways to find an efficient therapy against infections caused by these bacteria.

The genome sequencing and the phenotypic characterization of the 18 type strains of Bcc is still in progress and will provide much more information about their

virulence factors, antibiotics resistance and mechanisms of infections. All these information will be useful in fighting infections caused by these bacteria.

Papers related to the Thesis.

1. Bazzini S., Udine C., Sass A., Pasca M.R., Longo F., Emiliani G., Fondi M., **Perrin E.**, Decorosi F., Viti C., Giovannetti L., Leoni L., Fani R., Riccardi G., Mahenthiralingam E., Buroni S.

“Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*”

PLoS One. 2011 Apr 19;6(4):e18902

2. Papaleo M.C., Fondi M., Maida I., **Perrin E.**, Lo Giudice A., Michaud L., Mangano S., Bartolucci G., Romoli R., Fani R.

“Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against *Burkholderia cepacia* complex bacteria”

Biotechnol Adv. 2012 Jan;30(1):272-93. Epub 2011 Jun 29.

3. Mara K., Decorosi F., Viti C., Giovannetti L., Papaleo M.C., Maida I., **Perrin E.**, Fondi M., Vaneechoutte M., Nemec A., van den Barselaar M., Dijkshoorn L., Fani R.

“Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel”

Res Microbiol. 2012 Apr;163(3):161-72. Epub 2011 Dec 16.

4. Mocali S., Galeffi C., **Perrin E.**, Florio A., Migliore M., Canganella F., Bianconi G., Di Mattia E., Dell’Abate M. T., Fani R., Benedetti A.

“Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer”

Appl Microbiol Biotechnol. 2013 Feb;97(3):1299-315.

5. Fondi M., Orlandini V., Emiliani G., Papaleo M.C., Maida I., **Perrin E.**, Vaneechoutte M., Dijkshoorn L., Fani R.

“Draft Genome Sequence of the Hydrocarbon-Degrading and Emulsan-Producing Strain *Acinetobacter venetianus* RAG-1^T”

J Bacteriol. 2012 Sep;194(17):4771-2.

6. Fondi M., Orlandini V., Maida I., **Perrin E.**, Papaleo M.C., Emiliani G., de Pascale D., Parrilli E., Tutino M.L., Michaud L., Lo Giudice A., Fani R.

"Draft genome sequence of the volatile organic compound-producing Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. strain TB23, able to inhibit cystic fibrosis pathogens belonging to the *Burkholderia cepacia* complex."

J Bacteriol. 2012 Nov;194(22):6334-5.

7. Gamberi T., Rocchiccioli S., Papaleo M.C., Magherini F., Citti L., Buroni S., Bazzini S., Udine C., **Perrin E.**, Modesti A. and Fani R.

" RND-4 efflux transporter gene deletion in *Burkholderia cenocepacia* J2315: a proteomic analysis."

Journal of Proteome Science and Computational Biology 2013, 2:1

8. Fondi M., Rizzi E., Emiliani G., Orlandini V., Berna L., Papaleo M.C., **Perrin E.**, Maida I., Corti G., De Bellis G., Baldi F., Dijkshoorn L., Vaneechoutte M., Fani R.

"The genome sequence of the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter venetianus* VE-C3".

Res Microbiol. 2013 Jun;164(5):439-49.

9. Papaleo M.C., Romoli R., Bartolucci G., Maida I., **Perrin E.**, Fondi M., Orlandini V., Mengoni A., Emiliani G., Tutino M.L., Parrilli E., de Pascale D., Michaud L., Lo Giudice A., Fani R.

"Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria."

N Biotechnol. 2013 Apr 22

10. **Perrin E.**, Fondi M., Papaleo MC, Maida I, Emiliani G, Buroni S, Pasca MR, Riccardi G, Fani R.

"A census of RND superfamily proteins in the *Burkholderia* genus."

Future Microbiol. 2013 Jul;8:923-37.

11. Incandela M.L., **Perrin E.**, Fondi M., de Jesus Lopes Ribeiro A.L., Mori G., Moiana A., Gramegna M., Fani R., Riccardi G., Pasca M.R.

"DprE1, a New Taxonomic Marker in *Mycobacteria*"

FEMS Microbiol Lett. 2013 Aug 30.

12. Maida I., Fondi M., Papaleo M.C., **Perrin E.**, Orlandini V., Emiliani G., de Pascale D., Parrilli E., Tutino M.L., Michaud L., Lo Giudice A., Romoli R., Bartolucci G., Fani R.

"Phenotypic and genomic characterization of the Antarctic bacterium *Gillisia* sp. CAL575, a producer of antimicrobial compounds"

Extremophiles. 2013 Oct 23. [Epub ahead of print]

13. Orlandini V., Maida I., Fondi M., **Perrin E.**, Papaleo M.C., Bosi E., De Pascale D., Tutino M.L., Michaud L., Lo Giudice A., Fani R.

"Genomic analysis of three sponge-associated *Arthrobacter* antartic strains, inhibiting the growth of *Burkholderia cepacia* complex bacteria by synthesizing volatile organic compounds"

Microbiol Res. 2013 Oct 20. [Epub ahead of print]

14 Fondi M., Orlandini V., **Perrin E.**, Maida I., Bosi E., Papaleo M. C., Michaud L., Lo Giudice A., de Pascale D., Tutino M.L., Liò P. and Fani R.

"Draft genomes of three Antarctic *Psychrobacter* strains producing antimicrobial compounds against *Burkholderia cepacia* complex, opportunistic human pathogens"

Accepted for publication on Marine Genomics

15 Maida I., Lo Nostro A., Pesavento G., Barnabei M., Calonico C., **Perrin E.**, Chiellini C., Fondi M., Mengoni A., Maggini V., Vannacci A., Gallo E., Bilia A.R., Flamini G., Gori L., Firenzuoli F., Fani R.

"Exploring the anti-*Burkholderia cepacia* complex activity of essential oils: a preliminary analysis"

Submitted for publication to Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

16 Tedesco P., Visone M., Parrilli E., Tutino M.L., Perrin E., Maida I., Fani R., Ballestriero F., Tegos G., Di Schiavi E., de Pascale D.

"Novel insights into the interaction of *Burkholderia cepacia* complex strains revealed through the model host system *Caenorhabditis elegans*"

Submitted for publication to Future Microbiology

Index

Chapter 1 Introduction	1
The <i>Burkholderia</i> genus	2
General features	2
The plant associated beneficial and environmental (PBE) <i>Burkholderia</i> group	5
Plants, animals and humans pathogens	5
The <i>Burkholderia cepacia</i> complex (Bcc)	8
<i>Burkholderia cepacia</i> complex friends or foes?	11
<i>Burkholderia cepacia</i> complex and Chronic Granulomatous Disease	13
<i>Burkholderia cepacia</i> complex and Cystic Fibrosis	14
<i>Burkholderia cepacia</i> complex virulence factors	17
• <i>Genomic islands and mobile elements</i>	18
• <i>Alternative sigma factor and related proteins</i>	19
• <i>Quorum sensing</i>	19
• <i>Biofilms</i>	20
• <i>Lipopolysaccharide (LPS) and exopolysaccharide (EPS)</i>	21
• <i>Cable pili and 22-kDA adhesin</i>	22
• <i>Flagella</i>	22
• <i>Iron uptake</i>	23
• <i>Secretion systems and secreted proteins</i>	23
• <i>Colony variants</i>	24
• <i>Resistance to oxidative stress</i>	24
• <i>MgtG</i>	24
• <i>Phenylacetic acid and catabolic pathway</i>	24

<i>Burkholderia cepacia</i> antibiotics resistance	25
The Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) superfamily	27
General features	27
HAE-1 family	29
HME family	36
NFE family	37
APPE family	37
SecDF family	38
HAE_2 family	40
HAE_3 family	41
EST family	42
Regulation of expression RND proteins	43
Strategy to overcome RND-mediated drugs resistance	46
RND proteins in the <i>Burkholderia</i> genus	47
Bibliography	54
Chapter 2 Aims and presentation of the work	73
Chapter 3 Characterization of RND proteins in the <i>Burkholderia</i> genus	77
"A census of RND superfamily proteins in the <i>Burkholderia</i> genus"	90
"Deciphering the role of RND efflux transporters in <i>Burkholderia cenocepacia</i> "	105
"RND-4 efflux transporter gene deletion in <i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315: a proteomic analysis"	120

"Exploring the anti- <i>Burkholderia cepacia</i> complex activity of essential oils: a preliminary analysis"	134
--	-----

Susceptibility of RND operons deletion mutants to essential oils: preliminary results	164
---	-----

Chapter 4 Virulence in a *Caenorhabditis elegans* host model Bcc species

"Novel insights into the interaction of <i>Burkholderia cepacia</i> complex strains revealed through the model host system <i>Caenorhabditis elegans</i> "	176
--	-----

Chapter 5 Conclusion and Future Perspective

Appendix 1

Microbial Bioelectricity	224
"Alteration of bacterial communities and organic matter in microbial fuel cells (MFCs) supplied with soil and organic fertilizer"	228
DprE1, a new taxonomic marker in Mycobacteria	245
"DprE1, a new taxonomic marker in Mycobacteria"	248
Bibliography	256

Appendix 2

<i>Acinetobacter venetianus</i> : a diesel-fuel degrading bacterium	260
"Molecular and phenotypic characterization of <i>Acinetobacter</i> strains able to degradate diesel fuel"	266

"Draft genome sequence of the hydrocarbon-degrading and emulsan-producing strain <i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1 ^T "	278
"The genome sequence of the hydrocarbon-degrading <i>Acinetobacter venetianus</i> VE-C3"	280
New antimicrobial compounds from Antarctica	291
"Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against <i>Burkholderia cepacia</i> complex bacteria"	295
"Draft genome of the volatile organic compound-producing bacterium <i>Arthrobacter</i> sp. strain TB23, able to inhibit cystic fibrosis pathogens belonging to the <i>Burkholderia cepacia</i> complex"	317
"Bioactive volatile compounds from Antarctic (sponges) bacteria"	319
"Phenotypic and genomic characterization of the Antarctic bacterium <i>Gillisia</i> sp. CAL575, a producer of antimicrobial compounds"	334
"Genomic analysis of three sponge-associated <i>Arthrobacter</i> Antarctic strains, inhibiting the growth of <i>Burkholderia cepacia</i> complex bacteria by synthesizing volatile organic compounds"	349
"Draft genomes of three Antarctic Psychrobacter strains producing antimicrobial compounds against <i>Burkholderia cepacia</i> complex, opportunistic human pathogens"	358
Bibliography	366

CD with supplementary material

